

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 24/03/2019.

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA
CELULAR E MOLECULAR)**

**AVALIAÇÃO DO FATOR DE INÍCIO DE TRADUÇÃO DE EUCARIOTOS 5A
(eIF5A) NA TRADUÇÃO DAS PROTEÍNAS S6Ks**

LETICIA MENEGUELLO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Março - 2017

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA
CELULAR E MOLECULAR)**

**AVALIAÇÃO DO FATOR DE INÍCIO DE TRADUÇÃO DE EUCARIOTOS 5A
(eIF5A) NA TRADUÇÃO DAS PROTEÍNAS S6Ks**

LETICIA MENEGUELLO

Orientador: Prof. Dr. Augusto Ducati Luchessi

Março - 2017

547.75 Meneguello, Letícia
M541a Avaliação do fator de início de tradução de eucariotos 5A
(eIF5A) na tradução das proteínas S6Ks / Letícia Meneguello.
- Rio Claro, 2017
88 f. : il., figs., tabs., quadros

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Augusto Ducati Luchessi

1. Proteínas. 2. S6Ks. 3. S6K2. 4. eIF5A. 5. Controle
traducional. 6. Síntese proteica. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO DO FATOR DE INÍCIO DE TRADUÇÃO DE EUCARIOTOS 5A (eIF5A) NA TRADUÇÃO DAS PROTEÍNAS S6Ks

AUTORA: LETICIA MENEGUELLO

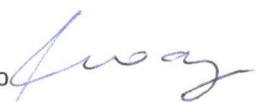
ORIENTADOR: AUGUSTO DUCATI LUCHESSI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. AUGUSTO DUCATI LUCHESSI
Faculdade de Ciências Aplicadas / UNICAMP



Profa. Dra. ALICE CRISTINA RODRIGUES
Departamento de Farmacologia / Universidade de São Paulo



Profa. Dra. MARIA IZABEL SOUZA CAMARGO
Departamento de Biologia / IB-Rio Claro



Rio Claro, 24 de março de 2017

AGRADECIMENTOS

Aos meu pais Aldemir e Fátima e à minha família querida pelo amor e apoio incondicional em todos os momentos. Vocês são o meu maior exemplo de força de vontade, trabalho e dedicação;

À Universidade Estadual Paulista (UNESP) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) pela oportunidade de realização do mestrado;

Ao Laboratório de Biotecnologia da Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA) da UNICAMP pela estrutura disponível para a realização do projeto de pesquisa;

Ao Prof. Dr. Augusto D. Luchessi pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, pela confiança depositada em mim e por todos os valiosos ensinamentos ao longo desses anos;

Ao meu noivo, amigo e companheiro André Pulschen por estar sempre ao meu lado me incentivando e por ser o meu porto seguro;

Em especial, aos meus amigos do Biotec, Letícia Tamborlin, Karina D. Pereira e André R. G. Proença, pela amizade e colaboração. Agradeço também as colaboradoras, Renata Caroline e Mariana Artal;

Ao Prof. Dr. Sandro R. Valentini pelo fornecimento da estrutura de seu laboratório e reagentes para a realização dos experimentos em colaboração;

À Natalia M. Barbosa do Laboratório de Biologia Molecular de Micro-organismos da UNESP-Araraquara pelos ensinamentos e pela grande ajuda com os experimentos de leveduras;

Ao Dr. Leo K. Iwai do Instituto Butantã pela contribuição com os experimentos de espectrometria de massas;

Ao Dr. Fernando M. Simabuco pela colaboração e contribuição com diversos reagentes utilizados no trabalho;

Aos membros dos Laboratórios NUTRE e LABGEN pela amizade e convivência;

À CAPES pelo primeiro ano de bolsa e a FAPESP pela bolsa de estudos (2014/27154-0) e apoio a pesquisa JP (2010/18095-0).

***“Nunca percorra pelo caminho traçado,
pois ele conduz somente até onde os
outros já foram.”***

Alexander Graham Bell

RESUMO

O fator de início de tradução de eucariotos 5A (eIF5A) caracteriza-se por ser a única proteína conhecida que apresenta o aminoácido hipusina, formado a partir de uma modificação pós-traducional chamada hipusinação. Apesar de originalmente eIF5A ter sido denominado como fator de início de tradução, a função de eIF5A têm sido relacionada principalmente com a etapa de alongação da tradução. Desde 2013, trabalhos importantes apresentaram evidências de que eIF5A hipusinado possui um papel fundamental na tradução de mRNAs específicos de proteínas que contém consecutivos resíduos de aminoácidos prolina (PPP ou PPG). Tendo em vista estas informações, o objetivo principal deste trabalho consiste no estudo da dependência de eIF5A na tradução da proteína ribossomal S6 kinase 2 (S6K2), pois a mesma apresenta em sua extremidade C-terminal uma região contendo cinco resíduos consecutivos de prolinas. Neste contexto, por meio da produção de uma proteína mutante (S6K2 Δ Pro), substituindo a região de poli-prolina de S6K2 pela sequência correspondente da proteína homóloga ribossomal S6 kinase 1 (S6K1), foram avaliadas a produção e habilidade fosforilativa da proteína mutante em comparação com S6K2 selvagem. Observou-se que S6K2 Δ Pro é produzida e sua superexpressão aumenta o conteúdo da proteína ribossomal S6 fosforilada, principal alvo de fosforilação das proteínas S6Ks, assim como a superexpressão das proteínas S6K1 e S6K2. Análises de silenciamento gênico em células HeLa, utilizando moléculas de siRNA para eIF5A, mostraram que a proteína S6K2 endógena não tem seu conteúdo alterado em função da depleção do conteúdo de eIF5A nas condições avaliadas. Além disso, regulando a expressão gênica de *TIF51A* (homólogo do gene *EIF5A* humano) em *Saccharomyces cerevisiae* foi observado que a tradução de S6K2 foi apenas levemente afetada pela redução do conteúdo de eIF5A quando comparado à proteína LDB17, uma proteína com conhecida dependência de eIF5A para sua tradução. Ademais, ensaios de imunoprecipitação de S6K2 e S6K2 Δ Pro seguido de identificação dos peptídeos por espectrometria de massas mostraram que a região de poli-prolina influencia as interações proteína-proteína de S6K2, visto que, com a mudança da sequência dessa região, observou-se uma interferência no perfil de proteínas associadas, com destaque para as proteínas com atividade transportadora. Dentre as proteínas identificadas, os resultados indicam que a interação de S6K2 com o fator de alongação 2 (eEF2) é influenciada pela região de prolinas presentes no C-terminal de S6K2.

Palavras-chave: S6K2, poli-prolina, eIF5A, S6Ks

ABSTRACT

The eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A), which is highly conserved among eukaryotes, contain the unusual amino acid hypusine, synthesized by a post-translational modification called hypusination. Even though eIF5A was first denominated as an initiation factor, it has been related to elongation step of the translation process. Since 2013, many studies proposed that eIF5A acts on rescue the ribosome stalling promoted by synthesis of poly-proline motifs containing PPP or PPG sequences. The aim of this study is to evaluate the eIF5A dependence on Ribosomal S6 kinase 2 protein (S6K2) translation, once S6K2 contains a poly-proline stretch on its C-terminus with five consecutive prolines (PPPPP). By producing a mutant protein (S6K2Pro), replacing the polyproline motif on S6K2 for the same region found on homologous protein Ribosomal S6 kinase 1 (S6K1), the content and phosphorylation activity were evaluated. It was observed that S6K2 Δ Pro is produced by HeLa cells and its RPS6 phosphorylation ability, which is the mainly target of S6Ks phosphorylation, is maintained. Analyzes using siRNA molecules for eIF5A gene silencing in HeLa cells have shown that the endogenous S6K2 protein does not have its content altered as a function of the depletion of the eIF5A content, under the conditions evaluated. Furthermore, by regulating the *TIF51A* gene expression (homologous of the human *EIF5A* gene) in *Saccharomyces cerevisiae* it was observed that the translation of S6K2 was only slightly affected by the reduction of the content of eIF5A when compared to the poly-proline LDB17 protein, a protein with known dependence of eIF5A for its translation. In addition, immunoprecipitation assays of S6K2 and S6K2 Δ Pro followed by identification of the peptides by mass spectrometry showed that the poly-proline region influences the protein-protein interactions of S6K2, since it was observed an interference in the profile of associated proteins, especially proteins classified as transport activity, in function of poly-proline replacement. Among the identified proteins, the results indicate that the interaction between S6K2 and the elongation factor 2 (eEF2) is influenced by the poly-proline region present at the C-terminal of S6K2.

Keywords: S6K2, polyproline, eIF5A, S6Ks

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismo de início da síntese proteica em eucariotos.	23
Figura 2 – Mecanismo de alongação da tradução de eucariotos.	24
Figura 3 – Mecanismo de hipusinação da proteína eIF5A.	25
Figura 4 – Proteínas envolvidas na via de mTOR/S6Ks.....	29
Figura 5 – Isoformas e domínios das proteínas S6K1 e S6K2 e os resíduos de ativação das proteínas via fosforilação pelo complexo mTORC1 e PDK1.	31
Figura 6 – Alinhamento das sequências de aminoácidos das regiões C-terminal de S6K1 e S6K2 humanas, com destaque para a sequência contendo cinco resíduos de prolina consecutivas.	33
Figura 7 – Alinhamento das sequências de aminoácidos das regiões C-terminal da proteína S6K2 de diferentes espécies de mamíferos.	33
Figura 8 – Mapa do vetor plasmidial pcDNA-FLAG utilizado na realização das construções pFLAG-S6K1, pFLAG-S6K2 e pFLAG-S6K2 Δ Pro.	37
Figura 9 – Sistema TET-OFF regulando a expressão gênica de <i>TIF51A</i>	48
Figura 10 – Plasmídeo utilizado nas construções pYES2-S6K1, pYES2-S6K2 e pYES2-S6K2 Δ Pro.	49
Figura 11 – Representação da sequência da construção S6K2 Δ Pro e análise do conteúdo das proteínas FLAG-S6K1, FLAG-S6K2 e FLAG-S6K2 Δ Pro.	52
Figura 12 – Análise da funcionalidade das proteínas FLAG-S6K1, FLAG-S6K2 e FLAG-S6K2 Δ Pro.	54
Figura 13 – Avaliação do conteúdo proteico e do transcrito de eIF5A em células HeLa após o silenciamento gênico por RNA de interferência e análise do conteúdo endógeno da proteína S6K2.....	56
Figura 14 – Leveduras com promotor de eIF5A reprimível por tetraciclina ou doxiciclina transformadas com os plasmídeos pBG1805-LDB17, pYES2-S6K1, pYES2-S6K2, pYES2-S6K2 Δ Pro.	58

Figura 15 – Gel corado com prata dos eluidos da IP de GFP (27 kDa), S6K2 (54 kDa) e S6K2 Δ Pro (54 kDa).	59
Figura 16 – Diagrama de Venn da representação das quantidades de proteínas identificadas pelo espectrômetro de massa nos ensaios de imunoprecipitações.....	60
Figura 17 – Classificações pelo sistema PANTHER das funções moleculares das proteínas identificadas no ensaio de interactoma de S6K2.....	62
Figura 18 – Classificações pelo sistema PANTHER das funções moleculares das proteínas identificadas no ensaio de interactoma de S6K2 Δ Pro.....	62
Figura 19 – Classificações pelo sistema PANTHER das funções moleculares das 74 proteínas identificadas na imunoprecipitação de S6K2 mas não de S6K2 Δ Pro.....	63
Figura 20 – Classificação pelo sistema PANTHER das funções biológicas das 74 proteínas identificadas na imunoprecipitação de S6K2 mas não de S6K2 Δ Pro.....	63
Figura 21 – Demonstração do <i>network</i> de interações de S6K2 com as 74 proteínas identificadas apenas no interactoma de S6K2 e não de S6K2 Δ Pro utilizando o programa STRING.	65
Figura 22 – Validação das interações de S6K2 por <i>western blotting</i>	67
Figura 23 – Certificado da premiação <i>SBBQ Award 2016</i>	88

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Oligonucleotídeos utilizados nas ampliações por PCR	36
Quadro 2 – Oligonucleotídeos utilizados nas ampliações de qPCR	44
Quadro 3 – Genótipo da levedura utilizada nos ensaios	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

40S	Subunidade menor ribossomal eucariótica
60S	Subunidade maior ribossomal eucariótica
80S	Ribossomo eucariótico
4E-BP	Proteína ligante do fator de início de tradução de eucariotos 4E
AGC	quinases PKA, PKG e PKC
ATP	Adenosina trifosfato
cDNA	DNA complementar
CTD	Domínio carboxi-terminal
C-terminal	extremidade carboxi-terminal
DHS	Deoxihipusina sintase
DMEM	<i>Dulbecco's modification of Eagle's medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)
DOOH	Deoxihipusina hidroxilase
EBOV	Ebola vírus
eEF1A	Fator de alongação de eucariotos 1A
eEF1B	Fator de alongação de eucariotos 1B
eEF2	Fator de alongação de eucariotos 2
eEF2K	Fator de alongação de eucariotos 2 - quinase
eIF1	Fator de início de tradução de eucariotos 1
eIF1A	Fator de início de tradução de eucariotos 1A
eIF2	Fator de início de tradução de eucariotos 2

eIF3	Fator de início de tradução de eucariotos 3
eIF4A	Fator de início de tradução de eucariotos 4A
eIF4B	Fator de início de tradução de eucariotos 4B
eIF4E	Fator de início de tradução de eucariotos 4E
eIF4F	Fator de início de tradução de eucariotos 4F
eIF4G	Fator de início de tradução de eucariotos 4G
eIF4H	Fator de início de tradução de eucariotos 4H
eIF5	Fator de início de tradução de eucariotos 5
eIF5A	Fator de início de tradução de eucariotos 5A
eIF5B	Fator de início de tradução de eucariotos 5B
EF-P	Fator de elongação P
EVH1	Drosophila vasodilatador-estimulado fosfo-proteína homóloga 1
GBL	Proteína G da subunidade-semelhante- β
GDP	Guanosina difosfato
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GTP	Guanosina trifosfato
GYF	Domínio glicina-tirosina-fenilalanina
HEK293	<i>Human Embryonic Kidney 293 cells</i>
HIV-1	Vírus da Imunodeficiência Humana-1
HM	Motivo hidrofóbico
IGF	(<i>Insulin Growth Factor 1</i>) - Fator de crescimento Insulina-1
IgG	Imunoglobulina G
KD	Domínio de quinase
LC	Cromatografia líquida

LB	meio Luria-Bertani
LBD17	LOB <i>domain-containing protein 17</i>
mRNA	RNA mensageiro
MS	Espectrometria de massas
mTORC1	Complexo1 <i>mammalian target of rapamycin</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NLS	Sítio de localização nuclear
NMD	<i>Nonsense mediated-decay</i>
NPC	Complexo do poro nuclear
NTD	Domínio amino-terminal
N-terminal	extremidade amino-terminal
p54-S6K2	Ribossomal S6 kinase 2 (54 kDa)
p70-S6K1	Ribossomal S6 kinase 1 (70 kDa)
PABP	Proteínas ligantes da cauda de poli-A
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDCD4	<i>Programmed cell death protein 4</i>
PDK1	Fosfoinosítídeo-dependente quinase-1
PDZ	Proteínas PSD95, DlgA e zo-1
PEG	polietilenoglicol
PI3K/AKT	Fosfatidilinositol-3-quinase
PKA	cAMP-dependent protein kinase
PKB	Protein kinase B/AKT
PKC	Proteína quinase C

PKG	cGMP-dependente proteina quinase
PPG	prolina-prolina-guanina
PPP	prolina-prolina-prolina
PTC	códon de terminação precoce
RAS/MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
REV	Regulador da transcrição do gene viral
RNA	Ácido ribonucleico
RPL11	proteína ribossomal L11
RPP0	proteína ribossomal P0
RPS5	proteína ribossomal S5
RPS6	proteína ribossomal S6
<i>RPS6KB1</i>	gene codificador da proteína humana S6K1
<i>RPS6KB2</i>	gene codificador da proteína humana S6K2
RT-PCR	<i>Reverse transcription</i> - PCR
qPCR	PCR quantitativa
S6K1	proteína ribossomal S6 kinase 1
S6K2	proteína ribossomal S6 kinase 2
S6K2 Δ Pro	proteína ribossomal S6 kinase 2 mutante de prolina
S6Ks	proteína ribossomal S6 kinase
siRNA	<i>small interfering</i> RNA
SDS	dodecilo sulfato de sódio
SDS-PAGE	dodecilo sulfato de sódio – Eletroforese gel de poli-acrilamida
SFB	soro fetal bovino
SH3	Domínio homólogo SRC 3

SC	meio sintético completo para levedura
Sítio A	sítio aminoacil
Sítio E	sítio de saída " <i>exit</i> "
Sítio P	sítio peptídil
TM	<i>turn motif</i>
TOS-MOTIF	motivo de reconhecimento de mTOR
t-RNA	RNA transportador
TET-OFF	Sistema de expressão gênica reprimível por tetraciclina
<i>TIF51A</i>	gene codificador de eIF5A
Triton X-100	polietilenoglicol-terc-octilfenil eter
Tween 20	monolaurato de polietilenoglicol-sorbitana
WW	Domínio de ligação WW
YPD	" <i>yeast extract, peptone, dextrose</i> " (meio rico para levedura)
ZIKV	Zika vírus

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
μL	microlitro
μM	micromolar
μg	micrograma
ACN	acetonitrila
CaCl ₂	cloreto de cálcio
Cm	centímetro
cm ³	centímetro cúbico
CO ₂	gás carbônico (dióxido de carbono)
DEPC	Dicarbonato de dietila
DMSO	dimetilsufóxido
DO	Densidade Óptica
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
HCl	ácido clorídrico
KCl	cloreto de potássio
kDa	quilodáton
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotássico
kV	quilovolt
M	molar
m/z	massa/carga
MgCl ₂	cloreto de magnésio

mL	mililitro
mM	milimolar
mm	milímetro
ms	milisegundo
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Fosfato dissódico heptahidratado
NaCl	cloreto de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
ng	nanograma
nL	nanolitro
nm	nanômetro
pmol	picomol
ppm	parte por milhão
rpm	rotação por minuto
TFA	ácido trifluoroacético
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
U	unidade de atividade enzimática
V	Volt
xg	aceleração gravitacional

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 O mecanismo de início da síntese proteica	22
1.2 A etapa de alongação da tradução	23
1.3 O fator de início de tradução de eucariotos 5A (eIF5A)	25
1.4 A proteína Ribossomal S6 kinase 2 (S6K2)	28
2 OBJETIVOS GERAIS.....	34
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	34
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Clonagem de DNA utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	35
3.1.1 Preparação dos insertos	35
3.1.2 Desfosforilação do vetor plasmidial.....	35
3.1.3 Reação de ligação.....	36
3.1.4 Preparo de <i>E. coli</i> competente	37
3.1.5 Transformação de <i>E. coli</i> competente.....	38
3.1.6 Preparação de DNA plasmidial de <i>E. coli</i> em pequena escala (Miniprep) pelo método de lise alcalina	38
3.1.7 Preparação de DNA plasmidial de <i>E. coli</i> em média escala (Midiprep).....	39
3.2 Análise do conteúdo de proteínas específicas em células HeLa por SDS-PAGE (<i>Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>) seguido de <i>western blotting</i>	39
3.2.1 Cultivo de células HeLa.....	39
3.2.2 Transfecção celular	40
3.2.3 Silenciamento gênico por RNA de interferência (<i>small interference RNA- siRNA</i>).....	40
3.2.4 Preparação de extratos proteicos e quantificação de proteína total.....	40
3.2.5 SDS-PAGE seguido de <i>western blotting</i>	41

3.3 Preparação de RNA total, síntese do cDNA e reação em cadeia pela polimerase (PCR) em Tempo Real	42
3.3.1 Preparação de RNA total	42
3.3.2 Transcrição reversa (RT): Síntese de cDNA	42
3.3.3 Reação em cadeia pela polimerase quantitativa (qPCR)	43
3.3.4 Análise de expressão gênica	43
3.4 Imunoprecipitação seguida de análise por LC-MS	44
3.4.1 Coloração de gel SDS-PAGE com nitrato de prata	45
3.4.2 Digestão Tripsínica em solução	45
3.4.3 Dessalinização com cartuchos Sep-Pak Light tC18	46
3.4.4 Análise no Espectrômetro de Massas	46
3.4.5 Análises proteômicas	47
3.5 Ensaio em modelo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> no sistema TET-OFF regulando a expressão gênica de <i>TIF51A</i>	48
3.5.1 Transformação de leveduras	50
3.5.2 Avaliação da dependência do homólogo de eIF5A em <i>S. cerevisiae</i> na produção das proteínas S6K1, S6K2 e S6K2ΔPro na linhagem TET-OFF	51
3.5.3 Extrato proteico de células de leveduras	51
4 RESULTADOS	52
4.1 Análise do conteúdo das proteínas FLAG-S6K1, FLAG-S6K2 e FLAG-S6K2ΔPro	52
4.2 Análise de expressão da proteína S6K2 mutada (S6K2ΔPro) e sua funcionalidade	53
4.3 Análise do silenciamento gênico de eIF5A via siRNA por RT-qPCR e <i>western blotting</i> e verificação da influência de seu <i>knockdown</i> na produção da proteína S6K2 em células HeLa	55
4.4 Análise da influência do homólogo de eIF5A em <i>S. cerevisiae</i> na tradução de S6K1, S6K2 e S6K2ΔPro regulando a expressão gênica de <i>TIF51A</i> no sistema TET-OFF	57

4.5 Imunoprecipitação das proteínas FLAG-GFP, FLAG-S6K2 e FLAG-S6K2ΔPro superexpressas em células HeLa e identificação das proteínas de interação por espectrometria de massas.....	58
4.6 Classificação das proteínas presentes na imunoprecipitação de S6K2 e de S6K2ΔPro utilizando o PANTHER	60
4.7 <i>Network</i> das interações de S6K2 com outras proteínas que podem ser influenciadas pela região de poli-prolina.....	64
4.8 Imunoprecipitação de FLAG-GFP, FLAG-S6K2 e FLAG-S6K2ΔPro superexpressas em células HeLa e validação das proteínas de interação por <i>western blotting</i>	66
5 DISCUSSÃO	68
6 CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
ANEXO 1 - Proteínas identificadas pelo espectrômetro de massas e as quantidades de peptídeos identificados.....	80
ANEXO 2 - Produções bibliográficas.....	87

1 INTRODUÇÃO

1.1 O mecanismo de início da síntese proteica

O mecanismo de síntese proteica consiste em um processo altamente regulado e complexo que ocorre de maneira coordenada com a atuação de uma série de proteínas denominadas eIF's, do inglês *eukaryotic Initiation Factors*, que são os fatores de início de tradução eucarióticos. A iniciação do processo de tradução ocorre com a formação do complexo de pré-iniciação 43S. O complexo 43S é composto pelo aminoácido metionina ligada à seu t-RNA (Met-tRNA) associado ao fator eIF2 ligado a uma molécula de GTP (eIF2-GTP) e a subunidade menor ribossomal 40S. A formação deste complexo conta com a participação de outros fatores de início de tradução como eIF3, eIF1, eIF1A, eIF5, que se associam a esse complexo (HINNEBUSCH AND LORSCH, 2012).

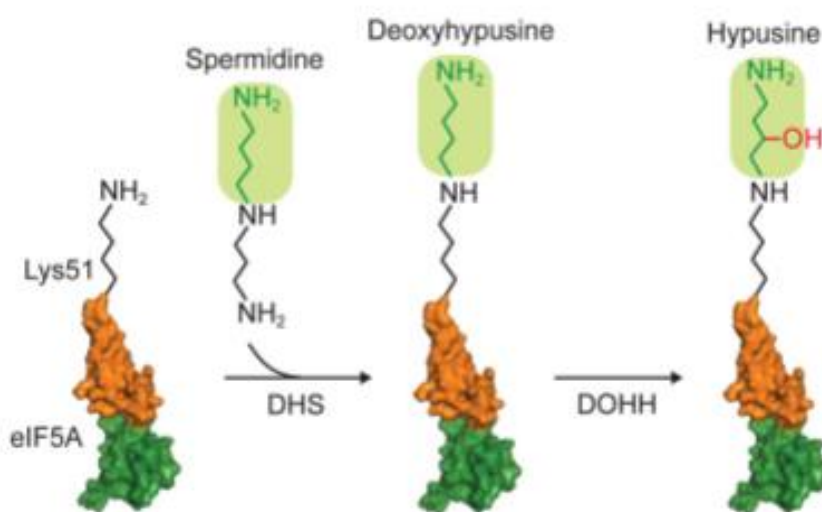
Em sequência, o complexo 43S reconhece e se liga à extremidade 5' de um RNA mensageiro, em um processo facilitado pela presença de fatores de início de tradução associados ao quepe, como eIF4B, eIF4H e o complexo eIF4F, formado pelos fatores eIF4E, eIF4G e eIF4A (HINNEBUSCH AND LORSCH, 2012). A presença destes fatores associados ao mRNA é um dos mecanismos de controle do processo de tradução, visto que o complexo eIF4F interage simultaneamente ao quepe, através de eIF4E, e a cauda de poli-A pela ligação de eIF4G com as proteínas ligantes da cauda de poli-A (PABP) e eIF4E (Figura 1), desta forma estabilizando a estrutura do mRNA (TARUN AND SACHS, 1996; WAKIYAMA et al., 2000). Com isso, antes de iniciar a síntese proteica é verificado se ambas as extremidades do mRNA encontram-se intactas, além de permitir a manutenção da conformação circular do mRNA para que a tradução ocorra de maneira eficiente (PESTOVA et al., 2007).

A seguir, o complexo 43S se transloca ao longo do RNA mensageiro na direção 5' para 3', até identificar o códon de iniciação, sendo a facilidade de reconhecimento determinada pela sequência consenso kozak A/GXXAUGA/G (KOZAK, 1981). O correto pareamento de bases entre o anti-códon do tRNA e o códon do mRNA permitindo que Met-tRNA_i fique presente no sítio P ribossomal é o evento inicial do reconhecimento do códon de iniciação. Após este reconhecimento,

1.3 O fator de início de tradução de eucariotos 5A (eIF5A)

O fator de início de tradução de eucariotos 5A (eIF5A) é uma proteína de aproximadamente 17 kDa altamente conservada entre eucariotos e seus homólogos em archaeas (KLIER et al., 1993a; KLIER et al., 1993b; PARK et al., 1997; PARK et al., 1993). As sequências de eIF5A de *Saccharomyces cerevisiae* e de humanos compartilham 63% de identidade, sendo que a proteína humana é capaz de substituir a de levedura, indicando que eIF5A de humano e de leveduras atue em processos celulares similares, como na síntese proteica (SCHNIER et al., 1991; CHEN AND LIU, 1997). eIF5A é a única proteína descrita que apresenta o resíduo do aminoácido hipusina, formado a partir de uma modificação pós-traducional denominada hipusinação (CHEN AND LIU, 1997; PARK et al., 1997). A hipusinação ocorre em duas etapas enzimáticas, em que na primeira etapa o radical amino-butil proveniente da poliamina espermidina é incorporado ao aminoácido lisina (K50, em humanos) pela enzima deoxyhipusina sintase (DHS), em sequência o intermediário deoxyhipusina é hidroxilado pela enzima deoxyhipusina hidroxilase (DOHH), formando a hipusina (PARK et al., 1993) (Figura 3). Da mesma forma, em procariotos uma modificação pós-traducional correlacionada com a hipusinação ocorre com o ortólogo de eIF5A encontrado em bactérias, o fator de alongação P (EF-P), em que apresenta no resíduo de lisina da região correspondente a modificação denominada lisinação (ROSSI et al., 2014).

Figura 3 – Mecanismo de hipusinação da proteína eIF5A.



Fonte: Retirado de Dever et al., (2014).

A proteína eIF5A por ser a única proteína eucariótica que contém a hipusina, têm-se sugerido que este fator pode atuar em processos biológicos fundamentais. Inicialmente, foi proposto a atuação de eIF5A na etapa da iniciação da tradução na qual a presença da hipusinação é essencial para sua atividade, visto que eIF5A humana recombinante, não hipusinada, foi incapaz de estimular a síntese *in vitro* de metionil-puromicina, ensaio que avalia a formação da primeira ligação peptídica (PARK, 1989; SMIT-MCBRIDE et al., 1989). eIF5A foi identificado associado à complexos de ribossomos durante a tradução, fortalecendo sua correlação com a síntese proteica (JAO AND CHEN, 2006, ZANELLI et al., 2006). Ademais, em ensaios de co-purificação seguidos de identificação por espectrometria de massas mostraram que eIF5A interage com componentes da maquinaria de tradução como as proteínas ribossomais RPP0, RPS5, RPL11 e com o fator eEF2 (ZANELLI et al., 2006). O fator eIF5A também já foi relacionado com a degradação de RNAs mensageiros com mutações sem sentido como códons de terminação precoce (PTC) pelo mecanismo do NMD (*Nonsense-mediated Decay*) (SCHRADER et al., 2006), além de ter sido associado ao transporte de macromoléculas pelo complexo do poro nuclear (NPC) (ROSORIOUS et al., 1999) destacando-se sua participação como cofator da proteína REV do vírus HIV-1 (BEVEC et al., 1996; KLIER et al., 1995; RUHL et al., 1993). Também foi demonstrado a atividade antirretroviral de fármacos que induzem a apoptose preferencial de células infectadas por HIV-1, através da inibição da reação de hidroxilação associada ao processo de hipusinação de eIF5A (HANAUSSKE-ABEL et al., 2013). Mais ainda, sugere-se que a inibição da hipusinação e redução do conteúdo de poliaminas pode ser utilizado como terapia antiviral de infecções causadas pelos vírus HIV-1, ebola (EBOV) e flavivírus como dengue e Zika (OLSEN AND CONNOR, 2017). Além disto, alguns estudos atestam que eIF5A está correlacionada com o desenvolvimento de algumas doenças como diabetes, malária, e diferentes tipos de câncer, sendo apontada como um possível e promissor alvo terapêutico por meio da utilização de drogas inibidoras da hipusinação (KAISER, 2012).

A partir de 2013, alguns estudos em leveduras apresentaram evidências de que eIF5A possui um papel fundamental na etapa de alongação da tradução de proteínas contendo sequências com regiões ricas em aminoácidos prolina. Isto se deve ao alívio da estagnação ribossômica que ocorre durante a tradução de

sequências PPG ou PPP promovida por eIF5A (GUTIERREZ et al., 2013). O mesmo fato foi observado em seu ortólogo bacteriano, o fator de alongação P (EF-P), que também promove a formação da ligação peptídica e estabiliza o RNA transportador (tRNA) presente no centro catalítico do ribossomo. Além disto, verifica-se que na ausência de EF-P ocorre uma severa repressão na produção de proteínas com longas extensões de prolinas (DOERFEL AND RODNINA, 2013, DOERFEL et al., 2013; UDE et al., 2013). Ademais, com a remoção de EF-P, também foi observado uma estagnação ribossomal em motivos di-prolil, no qual verificou nestes casos que a pausa ribossomal depende da natureza dos aminoácidos localizados antes e depois da dupla de resíduos de prolina (PEIL et al., 2013; WOOLSTENHULME et al., 2013). Com isso, a presença de duas prolinas ligadas no sítio P com o tRNA pode ocasionar a formação de uma conformação cis-trans ou de uma ligação rígida entre as prolinas (SAHA AND SHAMALA, 2012), fato que pode gerar o requerimento de EF-P/eIF5A para a síntese destas sequências. Entretanto, apesar destas observações, a função precisa de eIF5A hipusinada para este cenário ainda não encontra-se plenamente estabelecida. Alguns autores sugerem que a ligação de eIF5A hipusinado ao sítio adjacente ao sítio P e a inserção da hipusina no centro peptidil-transferase do ribossomo pode estericamente restringir a posição das prolinas no sítio P, permitindo o alinhamento apropriado do substrato para que ocorra a ligação peptídica (DEVER et al., 2014). Ou ainda, também sugere-se que eIF5A pode atuar como uma cis-trans isomerase de prolinas para corrigir a geometria de di-prolinas no sitio P, para que as prolinas entrem no túnel de saída ribossomal e formem a ligação peptídica com o substrato presente no sítio A (DEVER et al., 2014).

Proteínas com regiões ricas em prolinas são comumente encontradas em eucariotos (WILLIAMSON, 1994). Em humanos, observa-se em que 4,4% de todos os resíduos de prolina ocorrem em trímeros ou em sequências mais longas (MORGAN AND RUBENSTEIN, 2013). Já em bactérias, das aproximadamente 4000 proteínas existentes, cerca de 270 apresentam sequências com três ou mais prolinas sucessivas (DOERFEL et al., 2013). Proteínas ricas em prolinas estão presentes em diversas funções celulares, entretanto, proteínas com sequências consecutivas de seis ou mais prolinas foram associadas com o processamento do DNA/RNA (MORGAN AND RUBENSTEIN, 2013). Recentemente, um trabalho de

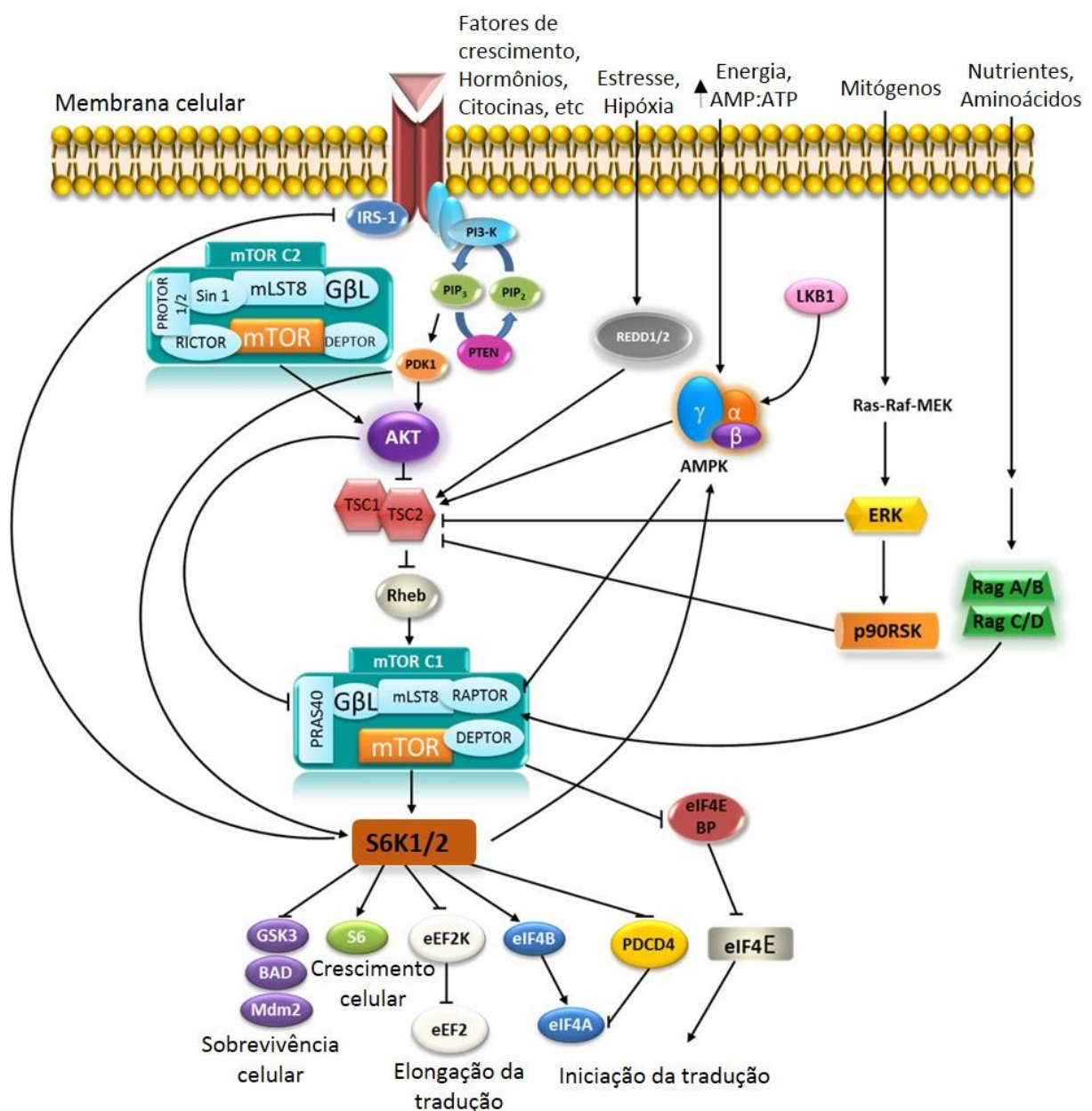
bioinformática relacionou a frequência de motivos PPP e PPG com a complexidade biológica do organismo, mostrando que o alto nível de poli-prolina associa-se a alguns processos biológicos específicos, incluindo funções relacionadas a actina e ao citoesqueleto, *splicing* de RNA, sinalização celular, entre outras. Neste contexto, sugere-se que eIF5A pode ter apresentado um importante papel durante a evolução (MANDAL et al., 2014). Proteínas contendo regiões ricas em prolina estão também associadas à mecanismos de controle traducional, como por exemplo a proteína Ribossomal S6 kinase 2 (S6K2), que apresenta cinco resíduos de aminoácido prolina em sua porção C-terminal.

1.4 A proteína Ribossomal S6 kinase 2 (S6K2)

A proteína S6K2 pertence as S6Ks, que são da classe de quinases do tipo AGC, juntamente com PKA, PKG e PKC. Existem dois genes codificadores de S6Ks, denominados de *RPS6KB1* e *RPS6KB2*, que produzem proteínas com 83% de identidade chamadas p70-S6K1 (70 kDa) e p54-S6K2 (54 kDa). As maiores divergências entre as sequencias de S6K1 e S6K2 são encontradas nas regiões N-terminal e C-terminal, enquanto S6K1 contém um domínio de ligação PDZ (denominado desta maneira devido as primeiras proteínas descritas contendo este domínio serem PSD95,DlgA e zo-1) em sua região C-terminal, já S6K2 possui um domínio rico em prolina (Pro) e um sítio de localização nuclear (NLS) em seu C-terminal (PARDO AND SECKL, 2013) (Figura 5). As proteínas S6Ks e o fator de início de tradução 4E binding protein (4E-BP) são substratos do Complexo1 mTOR (*mammalian target of rapamycin*), visto que suas ativações dependem da fosforilação por mTOR (PARDO AND SECKL, 2013). A fosforilação dos alvos de mTOR depende de três proteínas associadas: i) Adaptador sensível a rapamicina de mTOR, ii) Proteína G da subunidade-semelhante- β (GBL), iii) proteína rica em prolina kinase B (PKB) (KIM et al., 2002). A proteína mTOR funciona como um sensor da disponibilidade de nutrientes na célula sendo estimulada por quantidades elevadas de aminoácidos, ATP e insulina. Com isso, a via de insulina/IGF consiste no principal ativador das S6Ks, via sinalização por PI3K (phosphoinositide 3-kinase)/Akt para ativar mTORC1. Além disto, mTORC1 também pode ser ativado pela via Ras/MAPK de maneira independente de PI3K (FOSTER AND FINGAR, 2010). Sendo assim, ambas contribuem para a ativação das S6Ks. Quando a

disponibilidade de nutrientes é reduzida, mTOR é inibido e a autofagia passa a ser estimulada, permitindo que ocorra menor competição nas células pelos nutrientes escassos (EISENBERG-LERNER et al., 2009). Além disto, o complexo mTOR é fundamental em vários processos bioquímicos envolvidos com o metabolismo e crescimento celular, tais como, tradução, transcrição, biogênese do ribossomo, transporte de nutrientes e controle espacial da célula através do citoesqueleto (HALL, 2008).

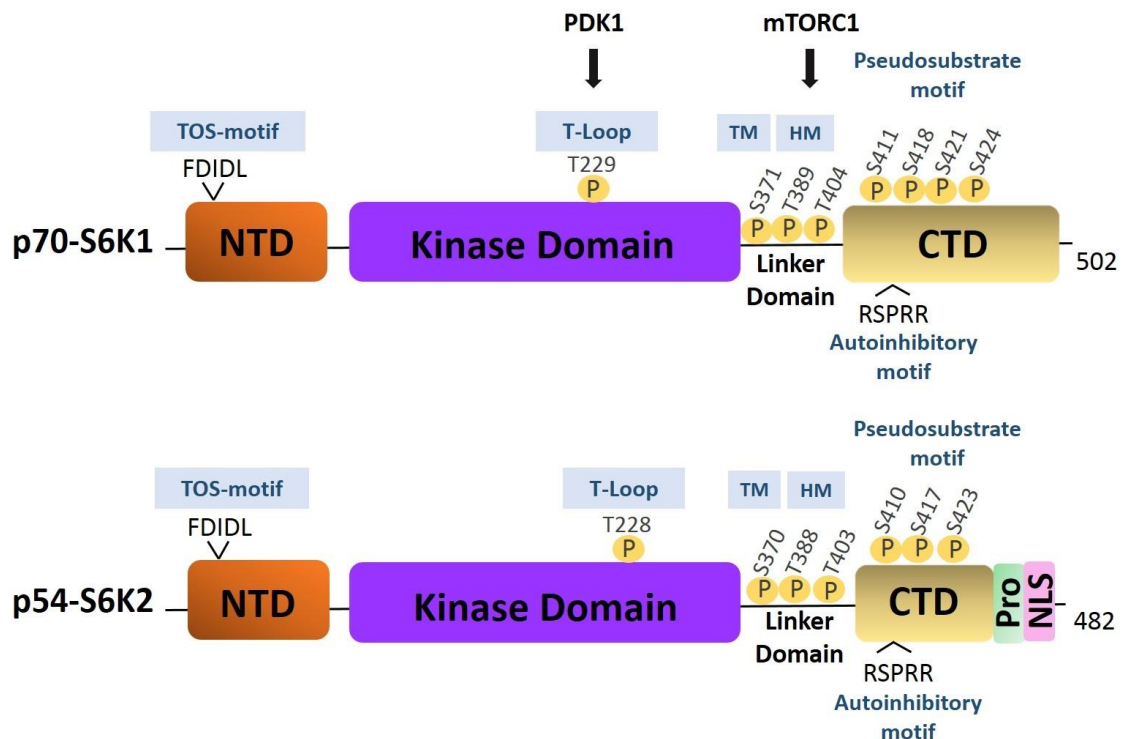
Figura 4 – Proteínas envolvidas na via de mTOR/S6Ks.



Fonte: Retirado de Hurtado et al., (2013), modificado.

Apesar de regiões divergentes nas sequências das S6Ks, vários aminoácidos em regiões regulatórias presentes em S6K1 são conservados em S6K2, como os sítios de fosforilação dirigidos por prolina (*proline-directed*), e os sítios de fosforilação de mTOR e PDK1, o que sugere mecanismos de ativação similares (LEE-FRUMAN et al., 1999). A região C-terminal de S6K1 possui uma função auto-inibitória pela interação com seu próprio N-terminal e desta forma, bloqueia a ativação do domínio de quinase da proteína (PRICE et al., 1991). O mecanismo de ativação de S6K1 inicia com a fosforilação de quatro resíduos de serina (Ser411, Ser418, Ser421 e Ser424) presentes no domínio auto-inibitório, resultando na exposição da região interna da proteína e permitindo a fosforilação do resíduo Thr389 por mTORC1. De maneira similar, a ativação de S6K2 é iniciada com fosforilações nos resíduos Ser410, Ser417 e Ser423, expondo a região interna para que mTORC1 fosforile S6K2 em Thr388 (Figura 5) (MAGNUSON et al., 2012; PHIN et al., 2003). Entretanto, em trabalhos anteriores foi relatado que a ativação de S6K2 pode sofrer influência de mecanismos independentes da fosforilação, como acetilação e ubiquitinação (WANG et al., 2008), destacando um possível mecanismo de regulação por interações proteína-proteína através da sua região rica em prolina na região C-terminal (GOUT et al., 1998). Esta região pode facilitar a interação com moléculas que contém os domínios *Src homology 3* (SH3) (YU et al., 1994), domínios WW (CHEN AND SUDOL, 1995) e outros domínios como EVH1 (BALL et al., 2002), GYF (FREUND et al., 2003) e Profilina (MAHONEY et al., 1997).

Figura 5 – Isoformas e domínios das proteínas S6K1 e S6K2 e os resíduos de ativação das proteínas via fosforilação pelo complexo mTORC1 e PDK1.



NLS: sinal de localização nuclear; NTD: domínio amino-terminal; KD: domínio de quinase; CTD: domínio carboxi-terminal; TOS-motif: região de reconhecimento de mTOR; TM: “turn motif”; HM: motivo hidrofóbico; Pro: domínio rico em prolina, domínio de pseudosubstrato auto-inibitório e motivo RSPRR. Fonte: Adaptado de Magnuson et al., (2012).

As proteínas S6Ks possuem como principal alvo de fosforilação a proteína ribossomal S6 (RPS6), na qual ambas são necessárias para a completa fosforilação da proteína, mas evidências indicam que S6K2 apresenta maior contribuição a esta resposta (PENDE et al., 2004). Historicamente, a fosforilação de RPS6 foi a primeira modificação pós-traducional descrita na literatura (GRESSNER AND WOOL, 1974). Entretanto, apesar da exata função desta fosforilação ainda não estar bem estabelecida, sabe-se que a ativação de RPS6 promove aumento na síntese proteica e progressão do ciclo celular, levantando a hipótese de que as S6Ks regulam o crescimento celular por afetarem positivamente a síntese proteica (CHAUVIN et al., 2014; KOH, 2013). Além de RPS6, fatores controladores do início da tradução (PDCD4 e eIF4B) e da elongação da tradução (eEF2K) também são

alvos de S6K1 e colaboram com o estímulo da síntese proteica mediada pelas S6Ks (MAGNUSON et al., 2012)

Diversas publicações apresentaram evidências de que as proteínas S6Ks desempenham papéis importantes em diferentes patologias, incluindo obesidade, diabetes, envelhecimento e câncer (FENTON AND GOUT, 2011). Além disto, a desregulação da via mTOR/S6K tem sido relatado como um evento que pode predispor a evolução de carcinomas. Porém, entre as S6Ks, a S6K2 possui maior evidência em relação à progressão de tumores, pois foi demonstrado sua importância na proliferação e sobrevivência celular em resposta à ativação de mTORC1, não envolvendo S6K1 (SRIDHARAN AND BASU, 2011). Outro trabalho identificou que a superexpressão de S6K2 em tecidos com câncer é mais frequente que a de S6K1, como nos cânceres de mama e endométrio (PARDO and SECKL, 2013).

A proteína S6K2 possui em sua extremidade C-terminal uma região rica em prolina, que contém cinco resíduos de aminoácidos prolina consecutivos, diferentemente da isoforma S6K1 que apresenta nesta mesma posição a sequência de resíduos de aminoácidos VTMSG (Figura 6). Além disto, observa-se através do alinhamento local da sequência de aminoácidos proteína S6K2 humana com diferentes espécies, que esta região é conservada em outros primatas e mamíferos (Figura 7). Embora S6K2 apresente semelhanças a S6K1 quanto a sua ativação, as possíveis interações proteína-proteína através da sua região rica em prolina na cauda C-terminal já foram citadas como um possível mecanismo de regulação (GOUT et al., 1998). Contudo, ainda não há relatos que descrevam tal mecanismo. Além disto, tendo em vista as evidências apresentadas na literatura de que a tradução de proteínas contendo sequências três ou mais prolinas (PPP ou PPG) dependem de eIF5A, buscou-se avaliar se a tradução da proteína S6K2 também ocorre neste contexto, uma vez que S6K2 contém um motivo contendo cinco resíduos de prolinas consecutivas.

Figura 6 – Alinhamento das sequências de aminoácidos das regiões C-terminal de S6K1 e S6K2 humanas, com destaque para a sequência contendo cinco resíduos de prolínas consecutivas.

S6K1_Hs	RKKTIDKILKCKLNLPPYLTPQEARDLLKLLKRNAAASRLGAGPGDAGEVQAHPFFRHINW
S6K2_Hs	RKKTMDKIIRGKLALPPYLTPDARDLVKKFLKRNPSQRIGGGPGDAADVQRHPFFRHMNW
	:: : ** ***** :***:***:*** :.*.*.***.*** *****:***
S6K1_Hs	EELLARKVEPPFKPLLQSEEDVVSQFDSKFTTRQTPVDSRDDSTLSEANQVFLGFTYVAPS
S6K2_Hs	DDLLAWRVDPFRPCLQSEEDVVSQFDRFTRQTPVDSRDDTALSEANQAFVFLGFTYVAPS
	::*** :*:***:* *****:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***
S6K1_Hs	VLESVKEKFSFEPKIRSPRRFIGSPRTPVSPVKFSPGDFWGRGASASTANPQTPEYPMPE
S6K2_Hs	VLDSIKEGFSFQPKLRSPRRLNSSPRAPVSPLKFSPFEGFRPSPSLPE-----PTELPLP
	.*:* *:***:***:***:***:***:***:*** : : . * *.* *:
S6K1_Hs	TSGIEQMDVTMSGEASAPLPIRQPNSSGPYKKQAFPMISKRPEHLRMNL 502
S6K2_Hs	P-----LLPPPPPSTTAPLPIRPPSGTKKSKRGRG----RPGR----- 482
	: :***:*** *.. *:* : ** :

Alinhamento realizado utilizando o programa ClustalW: *Multiple sequence alignment program-version 1.83 European Molecular Biology Laboratory- European Bioinformatics Institute (EMBL-IBI) (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>)*. Sequências S6K1 (NP_001258989.1) e S6K2 (NP_003943.2) obtidas do GeneBank.

Figura 7 – Alinhamento das sequências de aminoácidos das regiões C-terminal da proteína S6K2 de diferentes espécies de mamíferos.

<i>H. sapiens</i>	436	S P S L P E P T E L P L P P --- L L P P P --- P P S T T A P L P I R P P S G T K K S K R G ---	476
<i>P. troglodytes</i>	436	S P S L P E P T E L P L P P --- V L P P P --- P P S T T A P L P I R P P S G T K K S K R G ---	476
<i>M. mulatta</i>	463	S P S L P E P M E P L P P --- L L P P P P L P P S I T A P L P I R P P S G T K K S K R G ---	506
<i>C. lupus</i>	434	S S G P P E P M E P L P P --- L L P P P P P - P P S S T A P L P I R P P S G T K K S K R G ---	476
<i>B. taurus</i>	436	S P G P Q E L V E P L P P --- L L P P P P P P P S S T A P L P I R P P S G T K K S K R G ---	479
<i>M. musculus</i>	436	S P G P P E P M E P S L P P --- L L P S P P S P P P T S T A P L P I R P P S G T K K S K K G ---	479
<i>R. norvegicus</i>	436	S P G P P E P M E P S L P P --- L L P P P S S P P P T S T A P L P I R P P S G T K K S K K G ---	479

Fonte: Alinhamento realizado pelo HomoloGene do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene>). Observa-se a conservação da sequência de poli-prolina de S6K2 entre as espécies.

6 CONCLUSÕES

Em função dos resultados obtidos conclui-se que a depleção do domínio poli-prolina presente em S6K2, mas ausente em S6K1, não interfere com o seu perfil de expressão e não influencia sua capacidade fosforilativa intrínseca, como evidenciado pela fosforilação do principal alvo de fosforilação, a proteína RPS6 pela proteína mutante S6K2 Δ Pro desenvolvida neste estudo. Esta observação, portanto, revela que a proteína mutante S6K2 Δ Pro apresenta preservada sua atividade catalítica intrínseca.

A proteína S6K2 endógena não tem seu conteúdo alterado quando ocorre a depleção do conteúdo de eIF5A com o silenciamento gênico utilizando moléculas siRNA para eIF5A em células HeLa nos tempos testados. Além disso, diferente da proteína controle LBD17 que têm sua produção altamente prejudicada pela redução do conteúdo de eIF5A, a superexpressão S6K2 foi apenas pouco afetada pela repressão de eIF5A em modelo de *Saccharomyces cerevisiae* regulando a expressão gênica de *TIF51A*, o que indica que eIF5A não está envolvida na tradução de S6K2.

A região de poli-prolina de S6K2 é importante para as interações proteína-proteína de S6K2, como mostrado nos ensaios de imunoprecipitação seguido de LC-MS. Uma vez que, com a mudança da sequência dessa região observa-se que a interação de um sub grupo de proteínas fica possivelmente prejudicada, com destaque para as proteínas com atividade transportadora. Dentre as proteínas identificadas, o fator eEF2 foi validado pela primeira vez como uma das proteínas com interação a S6K2 e esta interação pode sofrer influência do seu domínio poli-prolina de S6K2.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arruda, A. P., M. Nigro, G. M. Oliveira and L. de Meis. (2007), 'Thermogenic Activity of Ca²⁺-ATPase from Skeletal Muscle Heavy Sarcoplasmic Reticulum: The Role of Ryanodine Ca²⁺ Channel', *Biochim Biophys Acta* Vol. 1768, No. 6, pp. 1498-505.
- Ball, L. J., T. Jarchau, H. Oschkinat and U. Walter. (2002), 'Evh1 Domains: Structure, Function and Interactions', *FEBS Lett* Vol. 513, No. 1, pp. 45-52.
- Ball, L. J., R. Kühne, J. Schneider-Mergener and H. Oschkinat. (2005), 'Recognition of Proline-Rich Motifs by Protein-Protein-Interaction Domains', *Angew Chem Int Ed Engl* Vol. 44, No. 19, pp. 2852-69.
- Ben-Shem, A., L. Jenner, G. Yusupova and M. Yusupov. (2010), 'Crystal Structure of the Eukaryotic Ribosome', *Science* Vol. 330, No. 6008, pp. 1203-9.
- Bevec, D., H. Jaksche, M. Oft, T. Wöhl, M. Himmelspach, A. Pacher, M. Schebesta, K. Koettnitz, M. Dobrovnik, R. Csonga, F. Lottspeich and J. Hauber. (1996), 'Inhibition of HIV-1 Replication in Lymphocytes by Mutants of the Rev Cofactor Eif-5a', *Science* Vol. 271, No. 5257, pp. 1858-60.
- Browne, G. J. and C. G. Proud. (2002), 'Regulation of Peptide-Chain Elongation in Mammalian Cells', *Eur J Biochem* Vol. 269, No. 22, pp. 5360-8.
- Chauvin, C., V. Koka, A. Nouschi, V. Mieulet, C. Hoareau-Aveilla, A. Dreazen, N. Cagnard, W. Carpentier, T. Kiss, O. Meyuhas and M. Pende. (2014), 'Ribosomal Protein S6 Kinase Activity Controls the Ribosome Biogenesis Transcriptional Program', *Oncogene* Vol. 33, No. 4, pp. 474-83.
- Chen, H. I. and M. Sudol. (1995), 'The Ww Domain of Yes-Associated Protein Binds a Proline-Rich Ligand That Differs from the Consensus Established for Src Homology 3-Binding Modules', *Proc Natl Acad Sci U S A* Vol. 92, No. 17, pp. 7819-23.
- Chen, K. Y. and A. Y. Liu. (1997), 'Biochemistry and Function of Hypusine Formation on Eukaryotic Initiation Factor 5a', *Biol Signals* Vol. 6, No. 3, pp. 105-9.
- Dever, T. E. and R. Green. (2012), 'The Elongation, Termination, and Recycling Phases of Translation in Eukaryotes', *Cold Spring Harb Perspect Biol* Vol. 4, No. 7, pp. a013706.
- Dever, T. E., E. Gutierrez and B. S. Shin. (2014), 'The Hypusine-Containing Translation Factor Eif5a', *Crit Rev Biochem Mol Biol* Vol. 49, No. 5, pp. 413-25.
- Doerfel, L. K. and M. V. Rodnina. (2013), 'Elongation Factor P: Function and Effects on Bacterial Fitness', *Biopolymers* Vol. 99, No. 11, pp. 837-45.
- Doerfel, L. K., I. Wohlgemuth, C. Kothe, F. Peske, H. Urlaub and M. V. Rodnina. (2013), 'Eif-P Is Essential for Rapid Synthesis of Proteins Containing Consecutive Proline Residues', *Science* Vol. 339, No. 6115, pp. 85-8.
- Dufner, A. and G. Thomas. (1999), 'Ribosomal S6 Kinase Signaling and the Control of Translation', *Exp Cell Res* Vol. 253, No. 1, pp. 100-9.
- Eisenberg-Lerner, A., S. Bialik, H. U. Simon and A. Kimchi. (2009), 'Life and Death Partners: Apoptosis, Autophagy and the Cross-Talk between Them', *Cell Death Differ* Vol. 16, No. 7, pp. 966-75.
- Ermeikova, K. S., N. Zambrano, H. Linn, G. Minopoli, F. Gertler, T. Russo and M. Sudol. (1997), 'The Ww Domain of Neural Protein Fe65 Interacts with Proline-Rich Motifs in Mena, the Mammalian Homolog of *Drosophila* Enabled', *J Biol Chem* Vol. 272, No. 52, pp. 32869-77.
- Fenton, T. R. and I. T. Gout. (2011), 'Functions and Regulation of the 70kDa Ribosomal S6 Kinases', *Int J Biochem Cell Biol* Vol. 43, No. 1, pp. 47-59.

- Foster, K. G. and D. C. Fingar. (2010), 'Mammalian Target of Rapamycin (Mtor): Conducting the Cellular Signaling Symphony', *J Biol Chem* Vol. 285, No. 19, pp. 14071-7.
- Freund, C., R. Kühne, S. Park, K. Thiemke, E. L. Reinherz and G. Wagner. (2003), 'Structural Investigations of a Gyf Domain Covalently Linked to a Proline-Rich Peptide', *J Biomol NMR* Vol. 27, No. 2, pp. 143-9.
- Fu, L. L., T. Xie, S. Y. Zhang and B. Liu. (2014), 'Eukaryotic Elongation Factor-2 Kinase (Eef2k): A Potential Therapeutic Target in Cancer', *Apoptosis* Vol. 19, No. 10, pp. 1527-31.
- Fujimura, K., S. Choi, M. Wyse, J. Strnadel, T. Wright and R. Klemke. (2015), 'Eukaryotic Translation Initiation Factor 5a (Eif5a) Regulates Pancreatic Cancer Metastasis by Modulating Rhoa and Rho-Associated Kinase (Rock) Protein Expression Levels', *J Biol Chem*.
- Garí, E., L. Piedrafita, M. Aldea and E. Herrero. (1997), 'A Set of Vectors with a Tetracycline-Regulatable Promoter System for Modulated Gene Expression in *Saccharomyces Cerevisiae*', *Yeast* Vol. 13, No. 9, pp. 837-48.
- Good, M. C., J. G. Zalatan and W. A. Lim. (2011), 'Scaffold Proteins: Hubs for Controlling the Flow of Cellular Information', *Science* Vol. 332, No. 6030, pp. 680-6.
- Gossen, M., A. L. Bonin and H. Bujard. (1993), 'Control of Gene Activity in Higher Eukaryotic Cells by Prokaryotic Regulatory Elements', *Trends Biochem Sci* Vol. 18, No. 12, pp. 471-5.
- Gossen, M. and H. Bujard. (1992), 'Tight Control of Gene Expression in Mammalian Cells by Tetracycline-Responsive Promoters', *Proc Natl Acad Sci U S A* Vol. 89, No. 12, pp. 5547-51.
- Gout, I., T. Minami, K. Hara, Y. Tsujishita, V. Filonenko, M. D. Waterfield and K. Yonezawa. (1998), 'Molecular Cloning and Characterization of a Novel P70 S6 Kinase, P70 S6 Kinase Beta Containing a Proline-Rich Region', *J Biol Chem* Vol. 273, No. 46, pp. 30061-4.
- Gressner, A. M. and I. G. Wool. (1974), 'The Phosphorylation of Liver Ribosomal Proteins in Vivo. Evidence That Only a Single Small Subunit Protein (S6) Is Phosphorylated', *J Biol Chem* Vol. 249, No. 21, pp. 6917-25.
- Gutierrez, E., B. S. Shin, C. J. Woolstenhulme, J. R. Kim, P. Saini, A. R. Buskirk and T. E. Dever. (2013), 'Eif5a Promotes Translation of Polyproline Motifs', *Mol Cell* Vol. 51, No. 1, pp. 35-45.
- Hall, M. N. (2008), 'Mtor-What Does It Do?', *Transplant Proc* Vol. 40, No. 10 Suppl, pp. S5-8.
- Hanauske-Abel, H. M., D. Saxena, P. E. Palumbo, A. R. Hanauske, A. D. Luchessi, T. D. Cambiaghi, M. Hoque, M. Spino, D. D'Alliessi Gandolfi, D. S. Heller, S. Singh, M. H. Park, B. M. Cracchiolo, F. Tricta, J. Connelly, A. M. Popowicz, R. A. Cone, B. Holland, T. Pe'ery and M. B. Mathews. (2013), 'Drug-Induced Reactivation of Apoptosis Abrogates Hiv-1 Infection', *PLoS One* Vol. 8, No. 9, pp. e74414.
- Harding, A., T. Tian, E. Westbury, E. Frische and J. F. Hancock. (2005), 'Subcellular Localization Determines Map Kinase Signal Output', *Curr Biol* Vol. 15, No. 9, pp. 869-73.
- Hinnebusch, A. G. and J. R. Lorsch. (2012), 'The Mechanism of Eukaryotic Translation Initiation: New Insights and Challenges', *Cold Spring Harb Perspect Biol* Vol. 4, No. 10.
- Hurtado, V., I. Roncero, E. Blazquez, E. Alvarez and C. Sanz. (2013), 'Glucagon-Like Peptide-1 and Its Implications in Obesity, Hot Topics in Endocrine and Endocrine-Related Diseases', *Hot Topics in Endocrine and Endocrine-Related Diseases*.

- Jao, D. L. and K. Y. Chen. (2006), 'Tandem Affinity Purification Revealed the Hypusine-Dependent Binding of Eukaryotic Initiation Factor 5a to the Translating 80s Ribosomal Complex', *J Cell Biochem* Vol. 97, No. 3, pp. 583-98.
- Kaiser, A. (2012), 'Translational Control of Eif5a in Various Diseases', *Amino Acids* Vol. 42, No. 2-3, pp. 679-84.
- Kapp, L. D. and J. R. Lorsch. (2004), 'Gtp-Dependent Recognition of the Methionine Moiety on Initiator Trna by Translation Factor Eif2', *J Mol Biol* Vol. 335, No. 4, pp. 923-36.
- Kay, B. K., M. P. Williamson and M. Sudol. (2000), 'The Importance of Being Proline: The Interaction of Proline-Rich Motifs in Signaling Proteins with Their Cognate Domains', *FASEB J* Vol. 14, No. 2, pp. 231-41.
- Kholodenko, B. N. (2006), 'Cell-Signalling Dynamics in Time and Space', *Nat Rev Mol Cell Biol* Vol. 7, No. 3, pp. 165-76.
- Kim, D. H., D. D. Sarbassov, S. M. Ali, J. E. King, R. R. Latek, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and D. M. Sabatini. (2002), 'Mtor Interacts with Raptor to Form a Nutrient-Sensitive Complex That Signals to the Cell Growth Machinery', *Cell* Vol. 110, No. 2, pp. 163-75.
- Klier, H., R. Csonga, H. C. João, C. Eckerskorn, M. Auer, F. Lottspeich and J. Eder. (1995), 'Isolation and Structural Characterization of Different Isoforms of the Hypusine-Containing Protein Eif-5a from Hela Cells', *Biochemistry* Vol. 34, No. 45, pp. 14693-702.
- Klier, H., T. Wohl, C. Eckerskorn, V. Magdolen and F. Lottspeich. (1993), 'Determination and Mutational Analysis of the Phosphorylation Site in the Hypusine-Containing Protein Hyp2p', *FEBS Lett* Vol. 334, No. 3, pp. 360-4.
- Klier, H., T. Wöhl, C. Eckerskorn, V. Magdolen and F. Lottspeich. (1993), 'Determination and Mutational Analysis of the Phosphorylation Site in the Hypusine-Containing Protein Hyp2p', *FEBS Lett* Vol. 334, No. 3, pp. 360-4.
- Klinge, S., F. Voigts-Hoffmann, M. Leibundgut, S. Arpagaus and N. Ban. (2011), 'Crystal Structure of the Eukaryotic 60s Ribosomal Subunit in Complex with Initiation Factor 6', *Science* Vol. 334, No. 6058, pp. 941-8.
- Koh, P. O. (2013), 'Ferulic Acid Attenuates Focal Cerebral Ischemia-Induced Decreases in P70s6 Kinase and S6 Phosphorylation', *Neurosci Lett* Vol. 555, pp. 7-11.
- Kornau, H. C., L. T. Schenker, M. B. Kennedy and P. H. Seeburg. (1995), 'Domain Interaction between Nmda Receptor Subunits and the Postsynaptic Density Protein Psd-95', *Science* Vol. 269, No. 5231, pp. 1737-40.
- Kozak, M. (1981), 'Possible Role of Flanking Nucleotides in Recognition of the Aug Initiator Codon by Eukaryotic Ribosomes', *Nucleic Acids Res* Vol. 9, No. 20, pp. 5233-52.
- Kühlbrandt, W. (2015), 'Structure and Function of Mitochondrial Membrane Protein Complexes', *BMC Biol* Vol. 13, pp. 89.
- Lee-Fruman, K. K., C. J. Kuo, J. Lippincott, N. Terada and J. Blenis. (1999), 'Characterization of S6k2, a Novel Kinase Homologous to S6k1', *Oncogene* Vol. 18, No. 36, pp. 5108-14.
- Li, T., B. Belda-Palazón, A. Ferrando and P. Alepuz. (2014), 'Fertility and Polarized Cell Growth Depends on Eif5a for Translation of Polyproline-Rich Formins in *Saccharomyces Cerevisiae*', *Genetics*.
- Magnuson, B., B. Ekim and D. C. Fingar. (2012), 'Regulation and Function of Ribosomal Protein S6 Kinase (S6k) within Mtor Signalling Networks', *Biochem J* Vol. 441, No. 1, pp. 1-21.

- Mahoney, N. M., P. A. Janmey and S. C. Almo. (1997), 'Structure of the Profilin-Poly-L-Proline Complex Involved in Morphogenesis and Cytoskeletal Regulation', *Nat Struct Biol* Vol. 4, No. 11, pp. 953-60.
- Mandal, A., S. Mandal and M. H. Park. (2014), 'Genome-Wide Analyses and Functional Classification of Proline Repeat-Rich Proteins: Potential Role of Eif5a in Eukaryotic Evolution', *PLoS One* Vol. 9, No. 11, pp. e111800.
- Mi, H., A. Muruganujan, J. T. Casagrande and P. D. Thomas. (2013), 'Large-Scale Gene Function Analysis with the Panther Classification System', *Nat Protoc* Vol. 8, No. 8, pp. 1551-66.
- Morgan, A. A. and E. Rubenstein. (2013), 'Proline: The Distribution, Frequency, Positioning, and Common Functional Roles of Proline and Polyproline Sequences in the Human Proteome', *PLoS One* Vol. 8, No. 1, pp. e53785.
- Noble, J. E. and M. J. Bailey. (2009), 'Quantitation of Protein', *Methods Enzymol* Vol. 463, pp. 73-95.
- Olsen, M. E. and J. H. Connor. (2017), 'Hypusination of Eif5a as a Target for Antiviral Therapy', *DNA Cell Biol*.
- Pardo, O. E. and M. J. Seckl. (2013), 'S6k2: The Neglected S6 Kinase Family Member', *Front Oncol* Vol. 3, pp. 191.
- Park, M. H. (1989), 'The Essential Role of Hypusine in Eukaryotic Translation Initiation Factor 4d (Eif-4d). Purification of Eif-4d and Its Precursors and Comparison of Their Activities', *J Biol Chem* Vol. 264, No. 31, pp. 18531-5.
- Park, M. H., Y. B. Lee and Y. A. Joe. (1997), 'Hypusine Is Essential for Eukaryotic Cell Proliferation', *Biol Signals* Vol. 6, No. 3, pp. 115-23.
- Park, M. H., E. C. Wolff and J. E. Folk. (1993), 'Hypusine: Its Post-Translational Formation in Eukaryotic Initiation Factor 5a and Its Potential Role in Cellular Regulation', *Biofactors* Vol. 4, No. 2, pp. 95-104.
- Pavan, I. C., S. Yokoo, D. C. Granato, L. Meneguello, C. M. Carnielli, M. R. Tavares, C. L. do Amaral, L. B. de Freitas, A. F. Paes Leme, A. D. Luchessi and F. M. Simabuco. (2016), 'Different Interactomes for P70-S6k1 and P54-S6k2 Revealed by Proteomic Analysis', *Proteomics*.
- Peil, L., A. L. Starosta, J. Lassak, G. C. Atkinson, K. Virumäe, M. Spitzer, T. Tenson, K. Jung, J. Remme and D. N. Wilson. (2013), 'Distinct Xppx Sequence Motifs Induce Ribosome Stalling, Which Is Rescued by the Translation Elongation Factor Ef-P', *Proc Natl Acad Sci U S A* Vol. 110, No. 38, pp. 15265-70.
- Pellicena, P. and W. T. Miller. (2001), 'Processive Phosphorylation of P130cas by Src Depends on Sh3-Polyproline Interactions', *J Biol Chem* Vol. 276, No. 30, pp. 28190-6.
- Pende, M., S. H. Um, V. Mieulet, M. Sticker, V. L. Goss, J. Mestan, M. Mueller, S. Fumagalli, S. C. Kozma and G. Thomas. (2004), 'S6k1(-)/S6k2(-) Mice Exhibit Perinatal Lethality and Rapamycin-Sensitive 5'-Terminal Oligopyrimidine Mrna Translation and Reveal a Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent S6 Kinase Pathway', *Mol Cell Biol* Vol. 24, No. 8, pp. 3112-24.
- Pereira, K. D., L. Tamborlin, L. Meneguello, A. R. de Proença, I. C. Almeida, R. F. Lourenço and A. D. Luchessi. (2016), 'Alternative Start Codon Connects Eif5a to Mitochondria', *J Cell Physiol* Vol. 231, No. 12, pp. 2682-9.
- Pestova, T. V., I. B. Lomakin, J. H. Lee, S. K. Choi, T. E. Dever and C. U. Hellen. (2000), 'The Joining of Ribosomal Subunits in Eukaryotes Requires Eif5b', *Nature* Vol. 403, No. 6767, pp. 332-5.

- Pestova, T. V., J. R. Lorsch and C. U. T. Hellen. (2007), 'The Mechanism of Translation Initiation in Eukaryotes', In S. N. Mathews M., Hershey JWB. (Ed.), *Translational Control in Biology and Medicine*, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Pfaffl, M. W., G. W. Horgan and L. Dempfle. (2002), 'Relative Expression Software Tool (Rest) for Group-Wise Comparison and Statistical Analysis of Relative Expression Results in Real-Time Pcr', *Nucleic Acids Res* Vol. 30, No. 9, pp. e36.
- Phin, S., D. Kupferwasser, J. Lam and K. K. Lee-Fruman. (2003), 'Mutational Analysis of Ribosomal S6 Kinase 2 Shows Differential Regulation of Its Kinase Activity from That of Ribosomal S6 Kinase 1', *Biochem J* Vol. 373, No. Pt 2, pp. 583-91.
- Price, D. J., N. K. Mukhopadhyay and J. Avruch. (1991), 'Insulin-Activated Protein Kinases Phosphorylate a Pseudosubstrate Synthetic Peptide Inhibitor of the P70 S6 Kinase', *J Biol Chem* Vol. 266, No. 25, pp. 16281-4.
- Qin, Z. H., Y. Wang, E. Sapp, B. Cuiffo, E. Wanker, M. R. Hayden, K. B. Kegel, N. Aronin and M. DiFiglia. (2004), 'Huntingtin Bodies Sequester Vesicle-Associated Proteins by a Polyproline-Dependent Interaction', *J Neurosci* Vol. 24, No. 1, pp. 269-81.
- Rodnina, M. V. and W. Wintermeyer. (2009), 'Recent Mechanistic Insights into Eukaryotic Ribosomes', *Curr Opin Cell Biol* Vol. 21, No. 3, pp. 435-43.
- Rosorius, O., B. Reichart, F. Krätzer, P. Heger, M. C. Dabauvalle and J. Hauber. (1999), 'Nuclear Pore Localization and Nucleocytoplasmic Transport of Eif-5a: Evidence for Direct Interaction with the Export Receptor Crm1', *J Cell Sci* Vol. 112 (Pt 14), pp. 2369-80.
- Rossi, D., R. Kuroshu, C. F. Zanelli and S. R. Valentini. (2014), 'Eif5a and Ef-P: Two Unique Translation Factors Are Now Traveling the Same Road', *Wiley Interdiscip Rev RNA* Vol. 5, No. 2, pp. 209-22.
- Ruhl, M., M. Himmelspach, G. M. Bahr, F. Hammerschmid, H. Jaksche, B. Wolff, H. Aschauer, G. K. Farrington, H. Probst and D. Bevec. (1993), 'Eukaryotic Initiation Factor 5a Is a Cellular Target of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Rev Activation Domain Mediating Trans-Activation', *J Cell Biol* Vol. 123, No. 6 Pt 1, pp. 1309-20.
- Ryazanov, A. G. (2002), 'Elongation Factor-2 Kinase and Its Newly Discovered Relatives', *FEBS Lett* Vol. 514, No. 1, pp. 26-9.
- Saha, I. and N. Shamala. (2012), 'Investigating Diproline Segments in Proteins: Occurrences, Conformation and Classification', *Biopolymers* Vol. 97, No. 1, pp. 54-64.
- Sasarman, F., C. Brunel-Guitton, H. Antonicka, T. Wai, E. A. Shoubridge and L. Consortium. (2010), 'Lrpprc and Slirp Interact in a Ribonucleoprotein Complex That Regulates Posttranscriptional Gene Expression in Mitochondria', *Mol Biol Cell* Vol. 21, No. 8, pp. 1315-23.
- Schnier, J., H. G. Schwelberger, Z. Smit-McBride, H. A. Kang and J. W. Hershey. (1991), 'Translation Initiation Factor 5a and Its Hypusine Modification Are Essential for Cell Viability in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*', *Mol Cell Biol* Vol. 11, No. 6, pp. 3105-14.
- Schrader, R., C. Young, D. Kozian, R. Hoffmann and F. Lottspeich. (2006), 'Temperature-Sensitive Eif5a Mutant Accumulates Transcripts Targeted to the Nonsense-Mediated Decay Pathway', *J Biol Chem* Vol. 281, No. 46, pp. 35336-46.
- Shaw, A. S. and E. L. Filbert. (2009), 'Scaffold Proteins and Immune-Cell Signalling', *Nat Rev Immunol* Vol. 9, No. 1, pp. 47-56.

- Smit-McBride, Z., J. Schnier, R. J. Kaufman and J. W. Hershey. (1989), 'Protein Synthesis Initiation Factor Eif-4d. Functional Comparison of Native and Unhyphusinated Forms of the Protein', *J Biol Chem* Vol. 264, No. 31, pp. 18527-30.
- Sridharan, S. and A. Basu. (2011), 'S6 Kinase 2 Promotes Breast Cancer Cell Survival Via Akt', *Cancer Res* Vol. 71, No. 7, pp. 2590-9.
- Szklarczyk, D., A. Franceschini, S. Wyder, K. Forslund, D. Heller, J. Huerta-Cepas, M. Simonovic, A. Roth, A. Santos, K. P. Tsafou, M. Kuhn, P. Bork, L. J. Jensen and C. von Mering. (2015), 'String V10: Protein-Protein Interaction Networks, Integrated over the Tree of Life', *Nucleic Acids Res* Vol. 43, No. Database issue, pp. D447-52.
- Tarun, S. Z. and A. B. Sachs. (1996), 'Association of the Yeast Poly(a) Tail Binding Protein with Translation Initiation Factor Eif-4g', *EMBO J* Vol. 15, No. 24, pp. 7168-77.
- Ude, S., J. Lassak, A. L. Starosta, T. Kraxenberger, D. N. Wilson and K. Jung. (2013), 'Translation Elongation Factor Ef-P Alleviates Ribosome Stalling at Polyproline Stretches', *Science* Vol. 339, No. 6115, pp. 82-5.
- Wakiyama, M., H. Imataka and N. Sonenberg. (2000), 'Interaction of Eif4g with Poly(a)-Binding Protein Stimulates Translation and Is Critical for *Xenopus* Oocyte Maturation', *Curr Biol* Vol. 10, No. 18, pp. 1147-50.
- Wang, M. L., G. Panasyuk, J. Gwalter, I. Nemazanyy, T. Fenton, V. Filonenko and I. Gout. (2008), 'Regulation of Ribosomal Protein S6 Kinases by Ubiquitination', *Biochem Biophys Res Commun* Vol. 369, No. 2, pp. 382-7.
- Wang, X., W. Li, M. Williams, N. Terada, D. R. Alessi and C. G. Proud. (2001), 'Regulation of Elongation Factor 2 Kinase by P90(Rsk1) and P70 S6 Kinase', *EMBO J* Vol. 20, No. 16, pp. 4370-9.
- Williamson, M. P. (1994), 'The Structure and Function of Proline-Rich Regions in Proteins', *Biochem J* Vol. 297 (Pt 2), pp. 249-60.
- Woolstenhulme, C. J., S. Parajuli, D. W. Healey, D. P. Valverde, E. N. Petersen, A. L. Starosta, N. R. Guydosh, W. E. Johnson, D. N. Wilson and A. R. Buskirk. (2013), 'Nascent Peptides That Block Protein Synthesis in Bacteria', *Proc Natl Acad Sci U S A* Vol. 110, No. 10, pp. E878-87.
- Yu, H., J. K. Chen, S. Feng, D. C. Dalgarno, A. W. Brauer and S. L. Schreiber. (1994), 'Structural Basis for the Binding of Proline-Rich Peptides to Sh3 Domains', *Cell* Vol. 76, No. 5, pp. 933-45.
- Zanelli, C. F., A. L. Maragno, A. P. Gregio, S. Komili, J. R. Pandolfi, C. A. Mestriner, W. R. Lustri and S. R. Valentini. (2006), 'Eif5a Binds to Translational Machinery Components and Affects Translation in Yeast', *Biochem Biophys Res Commun* Vol. 348, No. 4, pp. 1358-66.